

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Apel

Apel merupakan salah satu buah populer yang tersebar luas di dunia. Sekitar 59 spesies dan 7500 kultivar telah teridentifikasi dari seluruh dunia. Pemuliaan apel dengan hibridisasi konvensional memerlukan waktu yang lama karena tanaman apel memiliki masa juvenile yang panjang, inkompatibilitas tinggi, dan keragaman genetik alami yang tinggi. Kultur *in vitro* tanaman dapat menjadi metode alternatif untuk produksi metabolit sekunder dalam jumlah besar (Zahedzadeh, 2015).

Sistematika tanaman apel adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Superdivisio	: Spermatophyta
Divisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Rosales
Famili	: Rosaceae
Genus	: <i>Malus</i> Mill.
Spesies	: <i>Malus sylvestris</i> Mill.

(Sumber : <https://plants.usda.gov>. 08-07- 2017)

Apel termasuk dalam family rosaceae. Tanaman ini berasal dari pegunungan Caucasus di Asia Barat dan Eropa Timur. Apel dikenal sebagai rajanya buah buahan. Jenis apel yg menguasai pasar lokal yaitu kultivar Rome beauty, apel Australia atau apel hijau yg sebenarnya termasuk kultivar princess noble. Jenis manalagi berasal dari desa Gandon, Kecamatan Batu Malang yg merupakan pusat apel di Indonesia. Selain kultivar tersebut, masih ada satu jenis apel hijau lain yg

mempunyai prospek baik untuk dikembangkan yaitu apel ana. Apel ini didatangkan dari Thailand dan sudah mulai dikembangkan sejak tahun 1979 (Anonim, 2012).

Berikut ini adalah beberapa kultivar apel yang populer di Indonesia:

**a. Apel Manalagi**

Apel ini memiliki rasa yang manis walaupun masih muda dan aromanya harum. Diameter buah ini berkisar antara 5-7 cm dengan berat 75-160 gram per buahnya. Daging buahnya berwarna putih, kadar airnya hanya 84,05%. Bentuk bijinya bulat dengan ujung tumpul dan berwarna cokelat tua (Sufrida dkk., 2004).

**b. Apel Rome Beauty**

Apel jenis ini merupakan apel yang paling banyak ditanam petani di daerah Batu Malang yaitu sekitar 70%. Kulitnya tebal berwarna merah pudar, daging buahnya berwarna putih kekuningan. Memiliki kandungan air hingga 86,65%. Diameter buah ini berkisar antara 5 –12 cm dengan berat 70 –300 gram per buahnya (Sufrida, dkk., 2004).

**c. Apel Gala**

Apel ini merupakan hasil persilangan antara jenis apel Kidds Orange Red dengan apel Golden Delicious. Menurut penelitian buah ini berasal dari Selandia Baru, yang ditemukan oleh J. H Kidd pada tahun 1934. Bentuknya bulat berukuran sedang dengan warna semburat kuning dan jingga kemerahan. Tekstur daging buah renyah dan warna putih kekuningan (Sufrida dkk., 2004).

#### **d. Apel Fuji**

Apel fuji merupakan hasil seleksi antara Red Delicious dengan Ralls Janet yang dilakukan di Jepang. Fuji diperkenalkan tahun 1962 dan kini populer di Jepang, Cina, Korea dan Amerika. Di negara Jepang, apel fuji berwarna merah cerah dan ukurannya sebanding dengan Mc. Intosh. Sedangkan di Malang, kulitnya berubah warna menjadi merah hijau kecoklatan. Hal ini terjadi karena adanya perbedaan yang cukup besar antara kondisi agroklimat di Jepang dan di Indonesia (Sufrida dkk., 2004).

#### **2.2. Kandungan Gizi Buah Apel**

Walaupun belum menjadi buah yang umum dikonsumsi masyarakat Indonesia, apel dapat direkomendasikan sebagai sumber antioksidan dalam diet sehari-hari. Apel mengandung kadar flavonoid dalam jumlah tinggi (Wolfe dan Lee, 2003). Berbagai jenis turunan senyawaan ini telah berhasil diisolasi dan diuji bioaktivitasnya.

Lee *et al.* (2003) meneliti kandungan senyawaan fenolik utama dalam enam jenis apel dan mendapati kandungan terbesar dalam mg/100 g apel segar adalah quersetin glikosida (13,2 mg), prosianidin B2 (9,35 mg), asam klorogenat (9,02 mg), epikatekin (8,65 mg), floretin glikosida (5,59 mg), dan vitamin C (12,8 mg). Wolfe, Wu, dan Liu (2003) mendapatkan hal yang sama dengan katekin yang ada dalam apel adalah (+)-katekin dan (-)-epikatekin (dua kali lebih banyak dari katekin). Sementara Lata dan Tomala mendapatkan bahwa kulit apel mengandung hampir 40% flavonol, 30% askorbat, 20% total senyawaan fenolik, 14% total glutathione, dan 11% L-sistein. Klasifikasi fenolik dalam kulit apel

sebagai berikut: asam fenolat/ asam klorogenat, flavonoid yaitu flavan (katekin), prosianidin, flavonol (kuersetin glikosida), kalkon (florelin glikosida), dan antosianin (cianidin glikosida).

Wolfe, Wu, dan Liu (2003) menyatakan bahwa terdapat hubungan antara kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan pada apel. Uji kapasitas total antioksidan pada enam jenis apel yang dilakukan Lee *et al.* (2003) dengan menggunakan assay pemadaman radikal dengan ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) memperlihatkan urutan senyawaan fenolik menurut kemampuan antioksidannya sebagai berikut: quersetin, epikatekin, prosianidin B2, asam klorogenat, dan floretin. Vitamin C hanya menyumbang 11% dari total aktivitas antioksidan apel. Kuersetin memiliki aktivitas paling besar karena di dalam strukturnya terdapat O hidroksi dalam cincin B yang akan meningkatkan kestabilan bentuk radikal bebasnya.

### **2.3. Kultur *In vitro***

#### **2.3.1. Kultur kalus**

Kultur kalus merupakan salah satu bagian dari kultur *in vitro*. Kultur kalus bertujuan untuk memperoleh kalus dari eksplan yang diisolasi dan ditumbuhkan dalam lingkungan terkendali. Kalus tersusun oleh sel-sel parenkim yang mempunyai ikatan renggang dengan sel-sel yang lain, sehingga diharapkan kalus dapat memperbanyak dirinya secara terus menerus (Santoso dan Nursandi, 2002).

Kultur kalus adalah kultur dari induksi sel tanaman yang berdediferensiasi pada media yang biasanya mengandung auksin dengan konsentrasi yang tinggi atau kombinasi dari auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* (Filova, 2014).

Kultur kalus non-embryogenik mengandung kurang lebih gumpalan homogen dari sel-sel yang berdediferensiasi, biasanya digunakan untuk produksi metabolit sekunder. Pendekatan ini relatif sering digunakan untuk produksi flavonoid (Filova, 2014).

Tomes dalam Sutjahjo (1994), menjelaskan bahwa terdapat dua macam kalus yang terbentuk dalam kultur *in vitro* suatu tanaman, yaitu (1) kalus embriogenik dan (2) kalus non embriogenik. Kalus embriogenik adalah kalus yang mempunyai potensi untuk beregenerasi menjadi tanaman melalui organogenesis atau embryogenesis. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang mempunyai kemampuan sedikit atau tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi menjadi tanaman. Kalus embriogenik yang mempunyai struktur kompak, tidak tembus cahaya dan pertumbuhan relatif lambat merupakan tipe yang dikehendaki dalam seleksi *in vitro* tanaman. Kemampuan regenerasi kalus umumnya menurun sesuai lamanya jaringan dikulturkan, namun beberapa kultur kalus kemampuan regenerasinya dapat bertahan dalam jangka waktu relatif panjang.

### **2.3.2. Zat Pengatur Tumbuh**

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik yang disintesis salah satu bagian tanaman dan dipindahkan ke bagian lain. ZPT pada konsentrasi yang sangat rendah mampu menimbulkan suatu respon fisiologis, biokimia, dan morfologis (Wattimena, 1988; Salisbury dan Ross, 1995). Menurut Wattimena (1988), peran ZPT dalam pertumbuhan dan perkembangan kultur sangat besar. ZPT mengawali reaksi-reaksi biokimia dan mengubah komposisi kimia di dalam

media tanam, yang mengakibatkan terbentuknya organ tanaman seperti akar, daun, bunga, dan lain-lain.

Menurut Hendaryono dan Wijayanti (2004) zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologis tumbuhan. Zat pengatur tumbuh (ZPT) mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis kultur sel, organ, dan jaringan. Jika konsentrasi auksin lebih besar daripada sitokinin maka kalus akan tumbuh dan bila konsentrasi sitokinin lebih besar dibanding auksin maka tunas akan tumbuh (Gunawan, 1987 *cit.* Sudarmadji, 2003).

Beberapa peranan ZPT dalam kultur *in vitro* menurut Widyastuti dan Donowati (2001) sebagai berikut :

1. Senyawa sintetik yang disintesa diluar jaringan tanaman dan mempunyai sifat fisiologis dan biokimia yang serupa dengan hormone tanaman adalah ZPT. Hormon tanaman dan ZPT pada umumnya mendorong terjadi sesuatu pertumbuhan dan perkembangan.
2. Peranan auksin dalam kultur *in vitro* terutama untuk pertumbuhan kalus, suspensi sel, dan pertumbuhan akar. Bersama-sama sitokinin dapat mengatur tipe morfogenesis yang dikehendaki.
3. Pengaruh sitokinin di dalam kultur *in vitro* antara lain berhubungan dengan proses pembelahan sel, proliferasi tunas ketiak, penghambatan pertumbuhan akar tanaman dan induksi umbi mikro kentang

### 2.3.3. Pengaruh Cekaman Garam (NaCl) terhadap Tanaman

Natrium klorida (NaCl) merupakan garam yang paling banyak ditemukan di dunia. NaCl murni berbentuk kristal kubik berwarna putih dengan sifat fisik seperti pada Tabel 1.

**Tabel 1. Sifat fisik garam NaCl.**

Parameter	Karakteristik
Massa molekul, g/mol	58,4
Bentuk kristal	Kubik
Warna	Tidak berwarna – putih
Refraksi indeks	1,5442
Densitas, g/mL	2,165
Titik leleh, °C	801
Titik didih °C	1413
Kekerasan, skala Mohs	2,5
Kapasitas panas, J/g °C	0,853
Panas peleburan, J/g	517,1
Panas pelarutan, 1 kg H <sub>2</sub> O. 25 °C. kJ/mol	3,757
Kelembaban kritis pada 20 °C. %	73,3
Sumber : Othmer (1969)	

Efek garam pada sel tanaman dapat menyebabkan ketidakseimbangan ionik dan juga stress hiperosmotik (Tester and Davenport, 2003). Salah satu perubahan biokimia pada sel tanaman yang mengalami stress garam adalah produksi enzim antioksidan. Selain itu, tekanan garam juga menyebabkan peningkatan *species oxygen reactive* (ROS), yaitu *superoxide radicals* ( $O_2 \cdot^-$ ) dan *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ), yang menghasilkan stress oksidatif (Jehan *et al.*, 2012).

Produksi enzim antioksidan mengindikasikan adanya aktivitas antioksidan yang meningkat dalam kalus. Hal ini memicu kalus untuk mengeluarkan metabolit sekunder. Berdasarkan penelitian Jan *et al.*, (2015) NaCl menyebabkan peningkatan kadar protein, prolin, fenolik dan peroksidase. Kadar fenolik yang tinggi mengindikasikan tingginya akumulasi antioksidan.

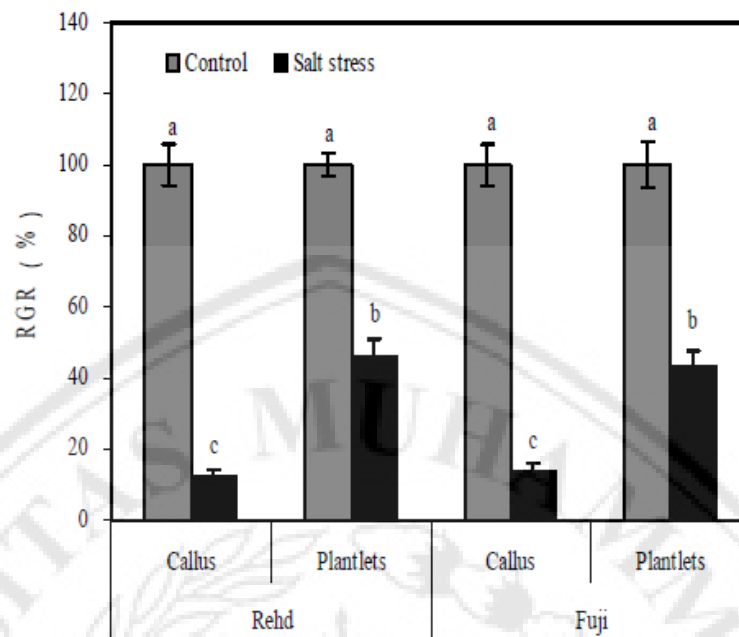
NaCl pada kalus dapat mempengaruhi tekanan osmotik serta mempengaruhi pembentukan jumlah embrio somatik karena NaCl menghambat proses pergerakan air yang melalui membran semipermeable karena perbedaan konsentrasi larutan. Hal ini membuat sel dalam keadaan hipertonik dimana air menentukan keseimbangan antara konsentrasi dalam dan luar sel dengan berpindah ke lingkungan. Semakin pekat larutan NaCl yang terkandung dalam media maka akan semakin banyak air dalam sel yang keluar sehingga membuat sel tumbuhan mengalami kematian Sari dan Ermavitalini, (2013).

Berdasarkan penelitian Sari dan Ermavitalini (2013), Warna kalus semakin gelap (coklat) pada konsentrasi 200 mM menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus semakin menurun. Molekul NaCl yang mengalami ionisasi menjadi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  sehingga terjadi peningkatan salinitas media yang menginduksi terjadinya cekaman ion dan mengakibatkan kematian sel-sel kalus. Selain itu, peningkatan konsentrasi NaCl juga menyebabkan terjadinya penurunan potensial air larutan pada media dan menginduksi terjadinya cekaman kekeringan.

Banyak studi yang mendukung bahwa respon antioksidan memiliki korelasi yang erat dengan toleransi NaCl pada sebagian besar spesies *Malus* seperti *Malus prunifolia* (Fu *et al.*, 2012), MM 106 (Molassiotis *et al.*, 2006) dan *Malus hupehensis* Rehd (Du *et al.*, 2002).

Hasil Penelitian Kai *et al.*, (2013), menunjukkan bahwa stress garam dengan konsentrasi 150 mM secara signifikan menghambat pertumbuhan kalus dan plantlet pada apel Rehd dan apel Fuji. Pada plantlet, tingkat RGR lebih baik yaitu sebesar 100% daripada pada kalus yang RGRnya kurang dari 50%. Hal ini membuktikan bahwa kalus lebih sensitif terhadap stress garam daripada plantlet. Ditunjukkan pada gambar berikut.





**Gambar 1. Grafik persentase *Relative Growth Rate* (RGR) kalus dan plantlet dari dua spesies *Malus* yang di kultur selama 15 hari pada media MS0 (kontrol) dan MS + 150 mM NaCl. (Kai, *et al.*, 2013)**

#### 2.3.4. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder adalah senyawa organik yang dihasilkan tumbuhan yang tidak memiliki fungsi langsung pada fotosintesis, pertumbuhan atau respirasi, transport solut, translokasi, sintesis protein, asimilasi nutrisi, diferensiasi, pembentukan karbohidrat, protein dan lipid. Metabolit sekunder yang seringkali hanya dijumpai pada satu spesies atau sekelompok spesies berbeda dari metabolit primer (asam amino, nukleotida, gula, lipid) yang dijumpai hampir di semua kingdom tumbuhan (Mastuti, 2016).

Berikut ini penggolongan jenis metabolit sekunder beserta jumlahnya:

**Tabel 2. Jenis dan Jumlah Metabolit sekunder Tanaman**

Jenis metabolit sekunder	Jumlah <sup>a</sup>
<b><i>Mengandung Nitrogen</i></b>	
Alkaloid	21 000
Asam amino bukan protein	700
Amina	100
Glikosida sianogenik	60
Glucosinolat	100
Alkamida	150
Lektin, peptida, polipeptida	2000
<b><i>Tanpa Nitrogen</i></b>	
Monoterpen (C10)b	2500
Sesquiterpen C15)b	5000
Diterpen (C20)b	2500
Triterpen, steroid, saponin (C30, C27)b	5000
Tetraterpen (C40)b	500
Flavonoid, tannin	5000
Fenilpropanoid, lignin, coumarin, lignan	2000
Poliacetilen, asam lemak, lilin	1500
Poliketida	750
Karbohidrat, asam organik	200

aPerkiraan jumlah dari struktur yang diketahui.

bTotal jumlah terpenoid melebihi 22000 saat ini.

Sumber: Wink (2010)

Kuersetin termasuk metabolit sekunder golongan senyawa flavonol yang paling banyak terdapat di alam dari pada jenis flavonoid yang lain. Kuersetin terdapat di buah apel yang berfungsi sebagai antioksidan dan anti aging.

## 2.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu

menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007).

Radikal bebas bersifat tidak stabil dan sangat reaktif yakni cenderung bereaksi dengan molekul lainnya untuk mencapai kestabilan. Radikal dengan kereaktifan yang tinggi ini dapat memulai sebuah reaksi berantai dalam sekali pembentukannya sehingga menimbulkan senyawa yang tidak normal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh. (Badarinath *et al.*, 2010). Radikal bebas dapat diatasi dengan penggunaan antoksidan (Mandal *et al.*, 2009).

DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dan bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik dan stabil selama bertahun-tahun. Nilai absorbansi DPPH berkisar antara 515-520 nm (Vanselow, 2007).

Metode peredaman radikal bebas DPPH didasarkan pada reduksi dari larutan methanol radikal bebas DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal bebas. Ketika larutan DPPH yang berwarna ungu bertemu dengan bahan pendonor elektron maka DPPH akan tereduksi, menyebabkan warna ungu akan memudar dan digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril (Prayoga, 2013).